::ODMA\MHODMA\iManage;293562;1
LMT/VJT/bsk(wlm)
02/26/02

PATENT APPLICATION
Docket No.:2896.1002-001

#13/
03.23.02

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants:	Klaus Unsicker, Jens Pohl, Michael Paulista and Rolf Bechtold		
Application No.:	09/527,275	Group:	1646
Filed:	March 17, 2000	Examiner:	O. Chernyshev
For:	Cytokines Having Neurotrophic Activity		

RECEIVED
MAR 2 2 2002
TECH CENTER 1600/2900

OIPE JC63
MAR 1 8 2002
PATENT & TRADEMARK OFFICE

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as First Class Mail in an envelope addressed to Assistant Commissioner for Patents, P.O. Box 2327, Arlington, VA 22202

on Mar. 13, 2002 (Date) Betsy S. Kirschner (Signature)

Betsy S. Kirschner
Typed or printed name of person signing certificate

DECLARATION OF KLAUS UNSICKER UNDER 37 C.F.R. § 1.131

Assistant Commissioner for Patents
P.O. Box 2327
Arlington, VA 22202

Sir:

I, Klaus Unsicker, a resident of Heidelberg, Germany, declare that:

1. I am a co-inventor of the above-referenced U. S. Patent Application.

2. I received a Doctor of Medicine from the University of Kiel, Germany. Since 1992 I have been employed at the Ruprecht-Karls-University of Heidelberg. I am currently leader of the Department of Neuroanatomy of the University of Heidelberg and hold the title of Professor of Anatomy & Cell Biology.

3. I have read U. S. Patent Application No. 09/527,275 and the Office Action mailed from the United States Patent and Trademark Office September 14, 2001.

4. I hereby state that the invention described and claimed in U.S. Patent Application No. 09/527,275 was completed in Germany, a World Trade Organization (WTO) member country, before June 5, 1997, the effective publication date of Louis, "Methods For Treating Photoreceptors Using Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) Protein Product," WO 97/19694.

5. Completion is evidenced by the enclosed Exhibits A-C, which represent copies of laboratory notebook pages 269-280, 281 and 282-287, which demonstrate the following:

Exhibit A — Pages 269-280 show that the combination of TGFβ1 and GDNF was tested in a survival assay of ciliar ganglion neurons (CG-Assay). This assay demonstrated the synergism of TGF-β with GDNF, which is also presented as Figure 6 in the present application.

Exhibit B — Page 281 shows that the combination of TGFβ1 and GDNF was tested in a survival assay of paravertebral sympathetic neurons (Bio-Assay/SG-Assay). The combination of TGF-β and GDNF demonstrated a synergistic neurotropic effect on paravertebral sympathetic neurons.

Exhibit C — Pages 282-287 show that the combination of TGFβ1 and GDNF was tested in a survival assay of sensoric spinal ganglion neurons (DRG-Assay). This assay demonstrated that the TGF-β and GDNF cytokine combination provided a synergistic neurotropic effect on dorsal root ganglion neurons.

6. In accordance with United States Patent and Trademark Office procedures, the dates recorded on these laboratory notebook pages have been redacted.

7. I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information or belief are believed to be true; and further that these statements are made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under § 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements, if made, may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

_____ _____

Klaus Unsicker Date

C6 - Assay: 2 Platten
Proben: TGFβ1, GDNF; TGFβ1 + GDNF; F3; VP; VP + TGFβ1, F3 + TGFβ1; F3 + GDNF; VP + GDNF; siehe Protokoll

ca. 1100 Zellen / well

C6 - Assay: Stoppen der Platten mit Glutardialdehyd (Montag gezählt)

C6 - Assay: 2 Platten
Proben: TGFβ1; GDNF; TGFβ1 + GDNF; F3; VP; F3 + GDNF; VP + GDNF; F3 + TGFβ1; VP + TGFβ1; siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

C6 - Assay: Stoppen der Platten mit Glutardialdehyd

B49: Überstand + Zellen vom 25.06.
TCA-Fällg: 1.5 ml 200 µl PBS

+ TCA → Protein-Pellet → in Probenpuffer aufgenommen

D6: 50 µl B49 Überstand bzw. Lysat + 50 µl D6-Puffer.
Je 2 µl N-Glycosidase-F hinzu.
17 h bei 37°C Inkubation

C6 - Assay: 1x Platte
Proben: VP; F3; VP + αGDNF; VP + αTGFβ1; F3 + αGD; F3 + αTGFβ1; TGFβ1 + GDNF; siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

270 SDS-PAGE : 15% T Laemmli, red.

+

Western-Blot

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B49	/	LMU	/	G1	G2	G3	/	Ü	Ü/DG	/
	/	5	/	15	15	15	/	20	20	/
	/	LMU	/	G1	G2	G3	/	Z	Z/DG	/
	/	5	/	15	15	15	/	20	20	/

$U = 125\,V$; $I_A = 70\,mA$; $I_E = 32\,mA$
$t = 1h\ 15'$

15' Äquilibrieren in Transferpuffer; NC-Membran + Gel

Blot: 15' = t; $U = 9-12\,V$; $I = 0..22\,A$

2-3' Ponceau-S
1h Block
1. AK

CG-Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd

W-Blot: 3 x 10' Waschen mit TTBS
2. AK (1:5000)

Chromaffine: 2 NN → Marke → Präparation siehe Protokoll

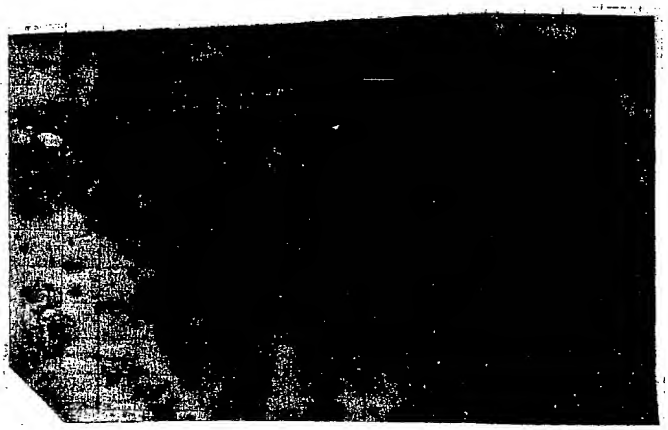
→ $178 \cdot 10^6$ Zellen → 25 Flaschen
(1:5) → $1.4 \cdot 10^6$ Zellen / Flasche

U-Blot: 3 x 10' Waschen mit TTBS (PAGE v. 19.07.)
→ ECL

Überstand

Lysat

1,5'



3'

B49: Überstand + Zellen

Stimulierung: 30h → mit

a) 10 µM Acetylcholin + 10 µM Eserin n = 10
b) 50 µM Nicotin n = 5
2 Kontrollen für b) 4 Kontrollen für a)

Durchführung: i) 2 ml Medium
ii) 15' Stimulierung → Medium (davon 1 2 µl Stabilisierungspuffer für HPLC)
iii) 10' Lyse → H_2O

272

CG-Assay: 2 Platten
Proben: F3, VP, F3 + TGFβ1, GDNF, F3 + TGFβ1 + GDNF, VP + TGFβ1, VP + GDNF, VP + GDNF + TGFβ1, TGFβ1 + GDNF, TGFβ1↓ + GDNF, F3 + α GDNF, F3 + αTGFβ1, VP + αGDNF, VP + αTGFβ1; siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

CG-Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd

CG-Assay: 2 Platten
Proben: GDNF, TGFβ1, FGF-2, [illegible] Kombinationen; siehe Protokoll

ca. 1200 Zellen / well

CG-Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd

Chromaffine: 1 NN → Mark → Präp nach Protokoll → 428.000 Zellen / CS → 8,56 · 10⁴ Zellen auf Cover slips ausgesät für EM

(ca. 2 ml eingefroren)

CG-Assay: 1e Platte
~~Proben~~: unbelegt bzw. zu wenig

CG-Assay: 2 Platten
Proben: F3, VP, αTGFβ1, αGDNF, TGFβ1, GDNF
D 1-5, I 1-3, II 1+2, III 1+2, IV 1-3 ACA-Fraktionen; siehe Protokoll
(ca. 1200 Zellen / well)

CG-Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd

CG-Assay: 1e Platte
Proben: D2+3; II 1, IV 1, F3, GDNF, TGFβ1; siehe Protokoll

Protein-Fällg: Chromatfine vom 25.05. und vom 11.07.
Überstand nach Stimulierung und Lysat

Protokoll → 3000 rpm (Heraeus) für 30' → Überstand
Max. rpm (-"-) für ca. 1h → -"-
10% TCA Endkonzentration → Vortex → für 1h (oder 1/2h)
auf Eis → 4000 rpm (Heraeus) für 15' → Pellet
je 1ml Aceton → 4000 rpm (Heraeus) für 15' →
je 1ml ΦMeOH → 4000 rpm (-"-) für 15'

Pellet in Probenpuffer aufnehmen (4-6 M Harnstoff)

CG-Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd

SDS-PAGE + Western-Blot: 15% Tricin, red.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Chr. 25.05.	/	LMW	/	G1	G2	G3	/	Ü	Lysat	/
	/	5	/	15	15	15	/	20	20	/
Chr. 11.07.	/	LMW	/	G1	G2	G3	/	Ü	Lysat	/
	/	5	/	15	15	15	/	20	20	/

U = 125 V; I_A = 76 mA; I_E = 35 mA; t = 1h 20'

Äquilibrieren der Nc-membran + Gel für 15' in Transferpuffer

Blot: t = 15'; I = 0.22 A; U = 9-12 V

1h Blocken; 1. AK

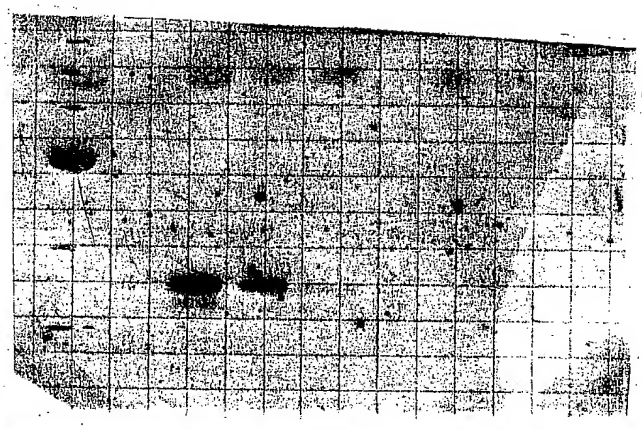
W-Blot: 3x 10' mit TTBS waschen ; 2. Ak

Chrom.: Präparation nach Protokoll ; 2 Nebenwerten

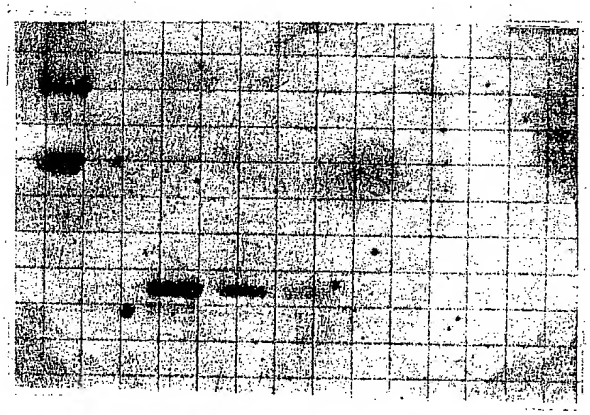
-> 176.25 · 10^6-Zellen → 1.175 · 10^6 Zellen / Flasche

W-Blot: 3x 10' mit TTBS waschen → ECL

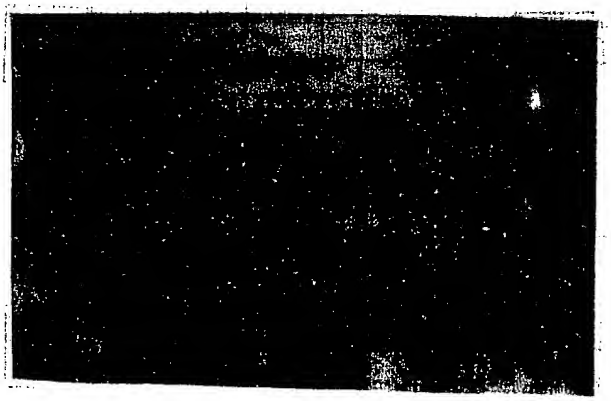
25.05.



11.07.



1'



5'

CG-Assay: 2 Platten
Proben F3; TGFβ1; GDNF; αTGFβ; GDNF; FGF-2;
Auftragungen siehe Protokoll
ca. 1200 Zellen / well

Stimlg.: (ca. 2 000 Zellen)
30 h → Stimulierung mit 10 µM Acetylcholin + 10 µM Eserin

Medium: 2 ml
Stimulierung: 2 ml; davon 100 µl + 2 µl Stabilisierungspuffer für HPLC
15' = t
Lyse: 2 ml H_2O; t = 10' (+ Zellen)

CG-Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd

CG-Assay: 2 Platten
Proben: TGFβ1; GDNF; Auftragungen siehe Protokoll
ca. 1300 Zellen / well

CF-Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd

Protein-Fällg.: Chromatfrei: Lysat und Überstand nach Stimulierg.

- 30' bei 3000 rpm (Heraeus) → Überstand
- Maximale rpm (Heraeus) für ca. 1 h → Überstand
- 10% TCA-Endkonzentration → Vortex → für 1 h auf Eis
- 15' bei 4000 rpm (Heraeus) → Pellet
- je 1 ml Aceton → 15' bei 4000 rpm (Heraeus)
- je 1 ml MeOH → -"-

Pellet in Probenpuffer + ca. 6/8 M Harnstoff aufnehmen

~~CF-Assay~~

SDS-PAGE + Western-Blot: 15% T - Laemmli, red.

276

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Gel 1+2	/	LMH	/	G1	G2	G3	G4	G5	G6	/
	/	5	/	10					10	/

t = 14 15'

Western - Blot : 1. Amersham NC-membran
2. Bio Rad

15' Äquilibrieren
15' Blot (I = 0.2 A ; U = 12 - 18 V)
60' Block
1. AK

CG - Assay: CNTF + AK's
FB, VI' + AK's Auftragung siehe Protokoll
→ Wdh !

CG - Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd

CG - Assay: 2 Platten

G + T ↓ und T + G ↓ → Ausgang: 2 mg/ml
Auftragung siehe Protokoll
Auswertung --

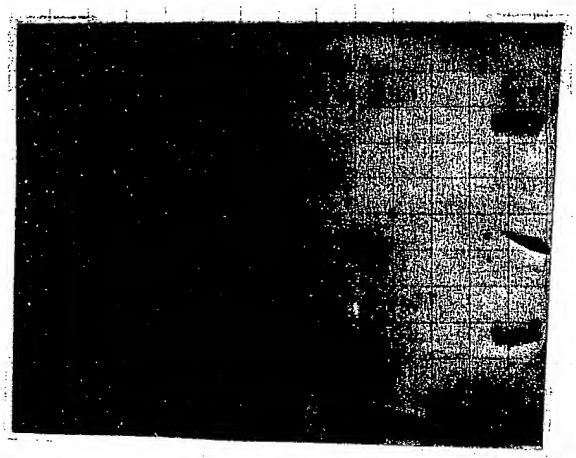
CG - Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd !

Western Blot: 3 x Waschen für 10' mit TTBS
2. AK

Western Blot: 5x 10' Waschen mit TTBS
ECL

Amersham

Bio Rad



1'

3'

B49: Ulkusrand → Dickdarm

Chromaffine: Präparation und Aufarbeitung nach Protokoll
→ 21,5 · 10^6 Zellen

CG-Assay: 2 Platten

Proben: T+G ↓ und G+T ↓ (Ausgang: 2ng/mL)

Auftragung und Auswertung siehe Protokoll

Chromaffine (3:00 Uhr): nach 30h Stimulierung mit 10µM Acetylcholin + 10µM Forsk

Medium: 2mL

Stimulierung: 2mL (davon 100µL + 2µL Stabilisierungspuffer für HPLC); t = 15'

Lyse: 2mL H_2O; t = 10' 1 + 2 Zellen ⇒ -80°C

CG-Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd

CG-Assay: 2 Platten

Proben: CNTF, T3, VP (+ Ak's)

Auftragung + Auswertung siehe Protokoll

CG-Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd

SDS-PAGE + Western Blot: 15% T-Acrylamid, red.

1. NC-Membran Bio Rad
2. -"- Millipore

Gel 1+2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/	LMW (high RM)	/	G1	G2	G3	G4	G5	G6	/
/	5 (4)	/	10	<———				——— >	10 /

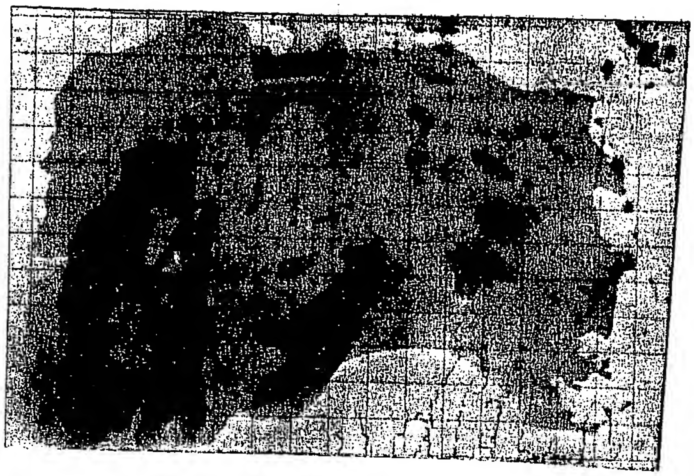
t = 1h 15° U = 12,5 V

Blot: 15'=t ⇐ 15' äquil.
60' Blot = 1.1h

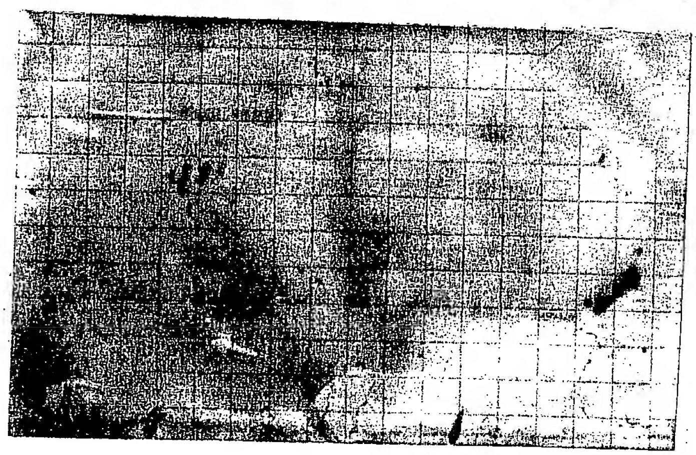
μM Eosin

ilisierungs-
1

30°C



1'



3'

CG-Assay: versch. FCS-Chargen (+ GDNF)
Auftragung + Auswertung siehe Protokoll

CG-Assay: Stoppen mit Glutardialdehyd

Western-Blot: 3x 10' Waschen mit TTBS
2. AK

SDS-PAGE + Western Blot: 15%T - Laemmli, red.
1. NC-Membran BioRad
2. -"- Amersham

280

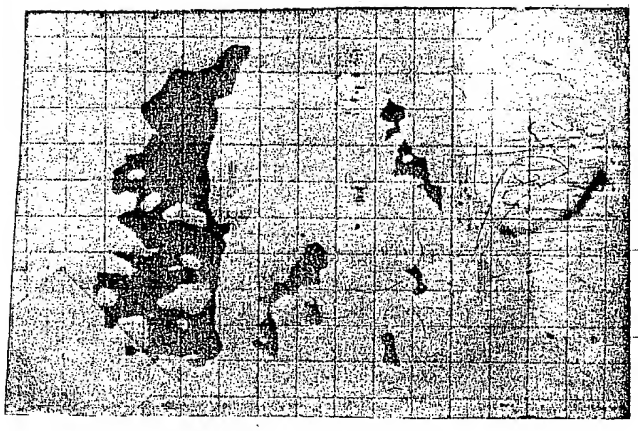
Gel 1+2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

/ RM / G1 G2 G3 G4 G5 G6 /

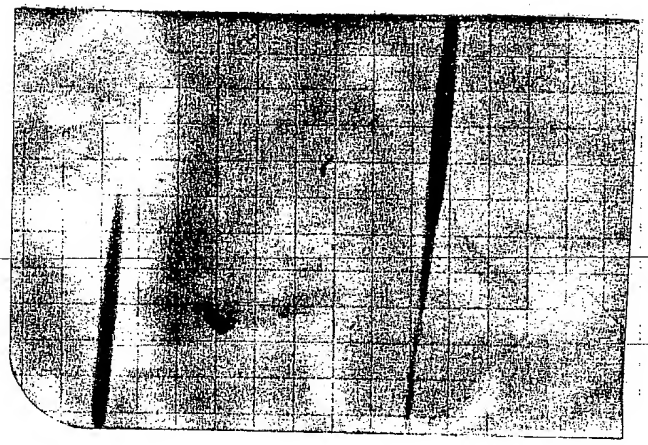
/ 4 / 10 ⟵ ⟶ 10 /

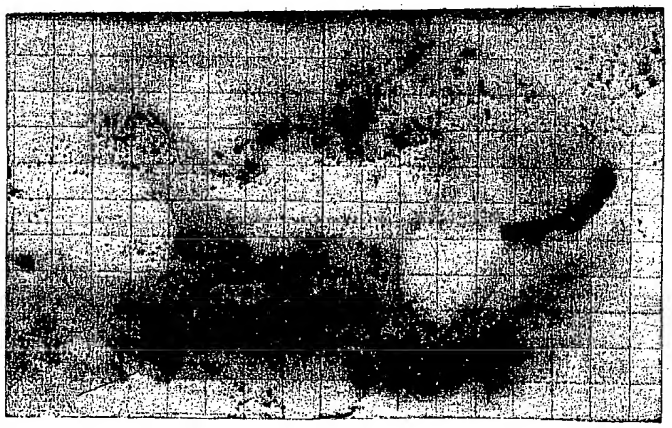
t = 1h 15' U = 12,5 V

Bio Rad Amersham

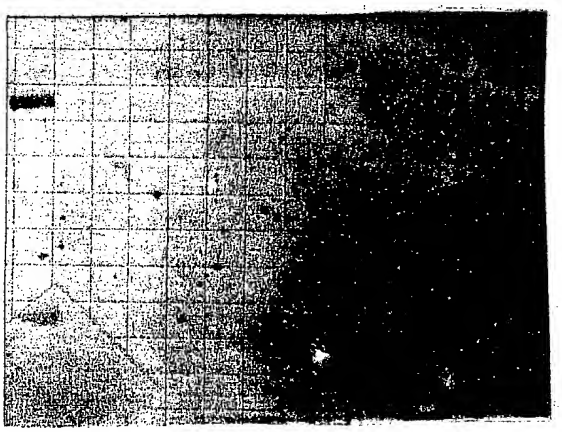


1'





3'



Blot: t = 15' ; Aqua bidest
t = 15' ; Blot
t = 60' ; Blocke
1 4K

I = 0,2 A ; U = 17 - 18 V

Western Blot : 3x 10' Waschen mit TTBS
1. AK

Western Blot : 3x 10' Waschen mit TTBS
ECL

CG-Assay : A) "normal" 2 Platten
B) nach "MN-Behandlg."

A) 127.500 Zellen → 1275 Z/well
B) 262.500 -"- → MN-Beh. → 97.000

Auftragung und Auswertung siehe Protokoll

(MN-Beh.: BSA-Kissen, Metrizamide, BSA-K.; panning)

MLEC-Assay : 1x Platte
Zellen ausgesät, 3h Ink.; Proben aufgetragen
über Nacht ink.
Auftragung und Auswertung siehe Protokoll

CG-Assay : Stoppen mit Glutardialdehyd

Western-Blot : 3x 10' mit TTBS waschen
ECL

MLEC-Assay : 1x Waschen mit PBS
Lyse Puffer (100µl/well) für 2-3h bei RT
80µl Lysat abziehen und messen - siehe Protokoll

Bio-Assay : CG E12 / SG E12 / SG E8
Proben: TGFβ1; GDNF; ~~[illegible]~~ siehe Protokoll

CG/E12: 155.000 Zellen → 1290 Zellen/well → Stop 12-09
SG/E12: 345.000 -"- → 3450 Zellen/well → } Stop 14-09
SG/E8: 132.500 -"- → 1950 Zellen/well

EXHIBIT
B

SG : Stoppen mit Glutardialdehyd

CG : Stoppen mit Glutardialdehyd

CG : FCS : verschiedene Chargen
TGFβ1 ; GDNF siehe Protokoll

165.000 Zellen → 1375 Zellen/Well

Bio-Assay : CG / DRG / SG : E12 siehe Protokoll
↓ ↓ ↓
13-09 19-09 20-09 Stop

CG : 155.000 Zellen → 1290
~~DRG : 142.500 " → 1190~~ } Zellen/Well
SG : 177.500 " → 1480

Proben : TGFβ1 ; GDNF

SDS-PAGE + Western Blot : 15.0% T Laemmli ; red.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/	RM	/	G1	G2	G3	F	DG/F	G3	/
/	4	/	←	10	→	←	20	→ 10	/

t = 1h 25' U = 125V I_A = 66mA I_E = 33mA

Blot : t = 15' äquilibrieren
t = 15' blotten I = 0.2A ; U = 18-19V
t = 60' Blockierg.
↑ 1.1k

EXHIBIT
C

2.5'

1'

CG: Stoppen mit Glutardialdehyd

Bio-Assay: DRG / E8 → Stop 20-09 siehe Protokoll

CG / DRG / SG E12 -"-

↓ ↓ ↓

19-09 20-09 21-09 Stop

DRG / E8: 160.000 Zellen → 1300 Zellen / well

CG / E12 160.000 -"- → 1250
DRG / E12 180.000 -"- → 1125 } Zellen / well
SG / E12 260.000 -"- → 1300

Western-Blot: 3x 10' waschen mit TTBS
2. AK

Bio-Assay: CG / DRG / SG , E12 siehe Protokoll

21-09 22-09 23-09 Stop

CG 110.000 Zellen → 1375 Zellen / well

DRG 11[redacted]70 Zellen → 1400
SG 290.000 -"- → 1320 Zellen/well

Western Blot: 3x Waschen je 10' mit TTBS - ECL

Bio-Assay: (2x) DRG / SG E8 siehe Protokoll
25-09 26-09 Stop

DRG : 332.500 Zellen → 1385 } Zellen/well
SG : 49.500 -"- → 830

Bio-Assay: CG / DRG E10
26-09 27-09 Stop

DRG / E14 rat 27-09 Stop } siehe Protokoll

CG E10 135.000 Zellen → 1125 Zellen/well
DRG 79.968 -"- → 1176 -"-

DRG E14 rat 156.000 -"- → 1300 -"-

Bio-Assay: CG / DRG E10 siehe Protokoll
28-09 29-09 Stop

CG 125.000 Zellen → 1250 Zellen/well
DRG 135.000 -"- → 1350 -"-

Bio-Assay: CG / DRG / SG E8 siehe Protokoll
08-10 09-10 10-10 Stop

CG: 255.000 /ml → 1275
DRG: 125.000 → 1170
SG: 80.000 -"- → 1180
} Zellen/ml

DG: 20% HS + 20% FCS

20 µl Serum + 80 µl Probenpuffer + 2 µl F-Glycanase
17 h bei 37°C inkubieren → Stop: 09-10

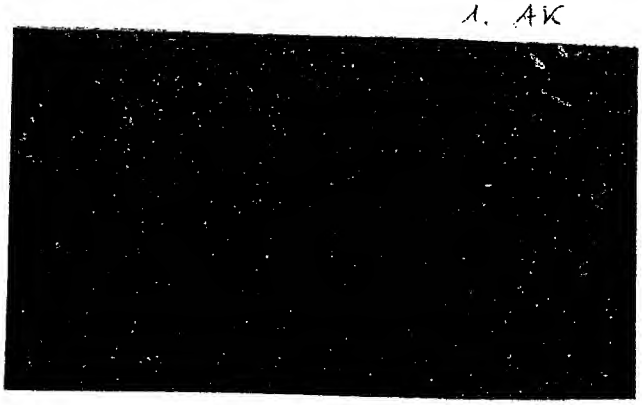
SDS-PAGE + Western Blot: 15% T Laemmli, red

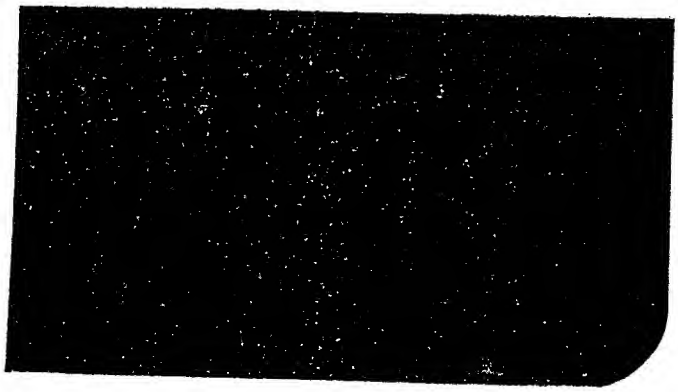
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
/	RM	/	G1	G2	G3	/	HS	DG HS	/
/	4	/	←	10	→	/	20	20	/
/	RM	/	G1	G2	G3	/	FCS	DG FCS	/
/	4	/	←	10	→	/	20	20	/

t = 1h 20' U = 125 V I_A = 76 mA I_G = 39 mA

Blot: t = 15' Äquilibrieren
t = 15' ; I = 0.2 A ; U = 13-17 V
t = 60' Blocken
1. AK

Blot


FCS


HS

3'


1'

Bio - Assay: E10 Stop: 12-10 siehe Protokoll

SG: 225.000 Zellen → 1400 Zellen/well

Western - Blot: 3x 10' mit TTBS waschen
2. AK

Western - Blot: 3x 10' mit TTBS waschen
ECL

Bio - Assay: SG / E12 siehe Protokoll

SG: 270.000 Zellen → 1350 Zellen/well
Stop: 14-10

Bio - Assay: CG / DRG E8 siehe Protokolle
15-10 16-10 Stop

CG: 152.500 Zellen → 1270
DRG: 160.000 -"- → 1333 } Zellen/well

Bio - Assay: SG IG8 → Stop: 19-10

CG / DRG / SG E10 } siehe Protokoll
17-10 18-10 19-10 Stop

SG / IG8: 92.500 Zellen → 1160 Zellen/well

CG / DRG / SG | E10:
110.000 -"- → 1100
130.000 -"- → 1080
115.000 -"- → 1150 } Zellen/well

Bio - Assay: CG / DRG / SG E8 nicht Protokoll
22-10 23-10 24-10 Stop

CG	120.000	Zellen	→	1200
DRG	100.000	-"-	→	1250
SG	120.000	-"-	→	1200

} Zellen / well

Bio-Assay: CG / DRG / SG E10 nicht Protokoll
24-10 25-10 26-10 Stop neues BSA
⊕ = CNTF 10 ng/ml

CG	100.000	Zellen	→	1250
DRG	130.000	-"-	→	1300
SG	175.000	-"-	→	1250

} Zellen / well

Bio - Assay: CG / DRG / SG E12
26-10 27-10 28 10 Stop nicht Protokoll

CG:	75000	Zellen	→	1100
DRG:	120.000	-"-	→	1200
SG:	185.000	-"-	→	1520

} Zellen / well

Bio - Assay: CG / DRG / SG E9
31-10 1-11 2-11 Stop nicht Protokoll

CG:	115.000	Zellen	→	1440
DRG	125.000	-"-	→	1250
SG	130.000	-"-	→	1300

} Zellen / well

Bio - Assay: CG / DRG / SG E10 nicht Protokoll
1-11 2-11 3-11 Stop

CG	110.000	Zellen	→	1250
DRG	125.000	-"-	→	1250
SG	120.000	-"-	→	1200

} Zellen / well